莪术基原植物DNA条形码序列的筛选与鉴定

张玉秀[1]，刘杨[2]，刘培卫[1]，符传坤[1]，卢丽兰[1]，魏建和[1,2*]

（1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所海南分所 海南省南药资源保护与开发重点实验室， 海口 570311；2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室&濒危药材繁育国家工程实验室，北京 100193）

摘要：为了寻找适用于中药材莪术基原植物鉴定的DNA条形码序列，探索快速高效的莪术基原植物鉴定的新方法，该文首先利用扩增成功率和测序成功率对中药材莪术3种基原植物，9个样本的7种DNA条形码序列（ITS、ITS2、*matK*、*psbA-trnH*、*trnL-trnF*、*rpoB* 和 *atpB-rbcL*）进行评估，然后利用MEGA6.0软件对获得的高质量的序列通过变异位点分析、遗传距离计算和系统树分析等进一步进行评估，最后我们还将筛选到的DNA条形码序列对未知基原的待测样品进行基原鉴定。结果显示，ITS、ITS2和*matK*等条形码序列在莪术基原植物中的扩增或测序成功率低，难以应用于实际鉴定，而*psbA-trnH*、*trnL-trnF*和*rpoB*等条形码序列变异位点信息过少，不足于区分莪术的3种不同基原植物，只有*atpB-rbcL*条形码序列的扩增和测序成功率高，容易获得高质量的序列，同时序列长度理想（642～645bp），变异位点多（11个），可实现莪术的3种不同基原的区分鉴别。待测样品经基于*atpB-rbcL*序列构建的系统发育树鉴别为温郁金。实验结果表明，叶绿体*atpB-rbcL*序列能够准确鉴定莪术不同基原植物，可以作为中药材莪术基原植物鉴定的条形码序列。

关键词：莪术，DNA条形码，筛选，*atpB-rbcL*，基原鉴定

Screening and Identification on sequences of original plants of curcumae rhizoma

ZHANG Yuxiu[1], LIU Yang[2], LIU Peiwei[1], FU Chuankun[1], LU Lilan[1], WEI Jianhe[1,2*]

(1. *Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,* Haikou 570311, China; 2. *Key Laboratory*

基金项目：海南省重大科技计划项目（ZDKJ2016006）[Supported by Hainan province Key Scientific and Technological Research and Development Special Program(ZDKJ2016006)]。

作者简介：张玉秀(1984-)，女，山东德州人，硕士，助理研究员，研究方向为中药质量评价与资源开发，（E-mail）scauzyx@163.com。

***通信作者：**魏建和，男，研究员，博士生导师，研究方向为药用植物基因资源、分子育种及次生代谢产物调控研究，（ E-Mail）wjianh@263.net。

of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to find a rapid and efficient identification method for three original species of *Rhizoma curcuma*,identification efficiency of different DNA barcoding sequences were evaluated in present study. Totally 14 samples of three different species of *R. curcuma* and samples to be identified were collected. After DNA extraction, PCR amplification and sequencing, seven kinds of DNA barcoding sequences, including ITS, ITS2, *matK, psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *rpoB* and *atpB-rbcL*, were compared in terms of success rate of PCR amplification and characteristics of sequences, firstly. Then, by variation site analysis and calculation of genetic distance, these seven kinds of DNA barcoding candidates were further evaluated. Finally the unidentified samples were identified by the phylogenetic tree based on the chosen DNA barcoding sequence. The results are as follows: ITS, ITS2 and *matK* barcoding sequences was inapplicable due to its low success rate of PCR amplification and sequencing; The variation information of *psbA-trnH*, *trnL-trnF* and *rpoB* was insufficient to distinguish three different species of *R. curcuma*; Only *atpB-rbcL* barcoding sequences was 642- 645 bp in length with 29.0%-29.9% GC content and 11 variation sites. What's more, the 3 species of *Rhizoma curcuma* were distinguished by *atpB-rbcL* barcoding sequences. According to the phylogenetic tree based on *atpB-rbcL* sequences, the unidentified samples were identified as *C. wenyujin*. These results show that *atpB-rbcL* sequence could be used as a standard sequence for the rapid and efficient identification of original species of curcumae rhizoma.
Keyword: *Curcumae rhizoma,* DNA barcode, screening , *atpB-rbcL,* species identification

中药材莪术由广西莪术（*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang）、蓬莪术（*C. phaeocaulis* Val.）和温郁金（*C. wenyujin* Y. H. Chen et C.Ling）的根茎加工而成，为我国常用中药材，具有行气破血、消积止痛等功效（中国药典，2015）。现代研究表明，不同来源莪术的化学成分和药效存在较大差异（吴伯英和李敏，2012）：莪术二酮、莪术醇、吉马酮和β-榄香烯等主要有效成分含量在不同来源莪术中有明显差异（毛春芹等，2013）；药效试验表明温郁金治疗胃癌和肝癌效果最好（唐德才等，2013；臧文华等，2014），妇科药保妇康栓的主要成分莪术油主要来源于温郁金（张永文和杨瑞琦，2010）。随着国内外市场对莪术的需求量日益增大，人工种植莪术已成为莪术药材的主要来源（吴正强和赵小文，2003），为了保证栽培选种正确，临床用药的安全有效，莪术基原植物的准确鉴别亟待解决。

广西莪术、蓬莪术和温郁金都为姜黄属植物，该属植物的传统鉴别主要基于花或叶片等的形态特征（Záveská e et al., 2012；沈荔荔等，2014；中国植物志，2004）。但莪术3种基原植物形态特征类似极易混淆，依靠形态特征的传统鉴定和分类比较困难（中国植物志，2004；肖小河等，2004），而人工栽培以及各地相互引种等因素加剧了分类的不确定性，因此有必要搞清楚各地种植莪术的基原和种质以保证正确种植。各学者分别运用显微鉴别、理化鉴别、RAPD分析和化学指纹图谱（杨丰庆等，2005；沈艳等，2014；肖小河等，2000/2001；刘双利等，2016）等对莪术基原植物进行了研究，但上述方法在实际应用中仍存在不少困难或者序列太长大大增加了应用的难度（曹晖等，2010）。

本研究通过对多种DNA条形码序列进行筛选，建立了适用于莪术3种基原植物的DNA条形码技术鉴定方法，同时也为姜黄属植物的分类和鉴定提供一定的参考。

1　材料与方法

1.1　材料

本实验共收集 14 份材料，包括 9 份试验样本和 5 份待检样本。蓬莪术、广西莪术和温郁金分别采自温州、广西、四川等道地产区，待测样本采自海南和江西等引种地，具体信息见表 1。材料由中国医学科学院药用植物研究所海南分所朱平老师鉴定。

表 1　植物样品来源与 GenBank 登录号

Table 1　Origins of plant samples and GenBank accession numbers

序号 No.	编号 Code	样品名 Sample name	样品来源 Sample source	GenBank 注册号 Registration number on GenBank			
				atpB-rbcL	*psbA-trnH*	*ropB*	*trnL-trnF*
1	A1	温郁金 *Curcuma wenyujin*	浙江瑞安陶山镇沙洲村 Shazhou village, Taoshan Town, Ruian City, Zhejiang Province	MH634539	MH634552	MH631010	MH596001
2	A2	温郁金 *C. wenyujin*	浙江瑞安马屿镇 Mayu Town, Ruian City, Zhejiang Province	MH634540	MH634550	MH631008	MH574912
3	A3	温郁金 *C. wenyujin*	浙江瑞安南滨 Nanbin street, Ruian City, Zhejiang Province	MH634541	MH634551	MH631009	MH574913
4	B1	广西莪术 *C.kwangsiensis*	广西灵山县陆屋镇 Luwu Town, Lingshan County, Qinzhou City, Guangxi Province	MH631001	MH615094	MH634559	MH574919
5	B2	广西莪术 *C.kwangsiensis*	广西灵山县陆屋镇 Luwu Town, Lingshan County, Qinzhou City, Guangxi Province	MH631002	MH615095	MH634560	MH574920
6	B3	广西莪术 *C.kwangsiensis*	广西灵山县陆屋镇 Luwu Town, Lingshan County, Qinzhou City, Guangxi Province	MH631003	MH615096	MH634561	MH574921
7	B4	广西莪术 *C.kwangsiensis*	广西贺州市 Hezhou City, Guangxi Province	MH634542	MK188719	MH634566	MH574922
8	C1	蓬莪术 *C.phaeocaulis*	成都崇州三桥村 Sanqiao village, Chongzhou City, Sichuan Province	MH634537	MH615097	MH634557	MH574917
9	C2	蓬莪术 *C.phaeocaulis*	成都双流舟渡村 Zhoudu village, Shuangliu District, Sichuan Province	MH634543	MH615098	MH634558	MH574918
10	D1	待测样品 Sample to be tested	海南临高 Lingao County, Hainan Province	MH630999	MH634548	MH631007	MH574915
11	D2	待测样品 Sample to be tested	海南海口琼山 Qiongshan District, Haikou City, Hainan Province	MH631000	MH634549	MH631006	MH574916

12	D3	待测样品 Sample to be tested	海南澄迈 Chengmai County, Hainan Province	MH631004	MH634547	MH631005	MH574914
13	E1	待测样品 Sample to be tested	江西新余 Xinyu City, Jiangxi Province	MK188714	MK188717	MK188723	MK188706
14	E2	待测样品 Sample to be tested	江西新余 Xinyu City, Jiangxi Province	MK188713	MK188718	MK188724	MK188707

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的提取、扩增和测序

每个样品取 100 mg 新鲜叶片，参照植物基因组 DNA 提取试剂盒(OMEGA HP Plant DNA Kit， 美国）提取 DNA。提取后的总 DNA 用微量核酸蛋白测定仪（Thermo，美国）进行质量检测。PCR 扩增使用的引物和扩增程序参照相关文献（表 2）。PCR 反应体系为 25 μL，其中 2x EcoTaq PCR SuperMix(Transgen, 中国) 12.5 μL， 正反引物各 1 μl，DNA 模板 20 ng。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。扩增成功的 PCR 产物送到华大基因公司纯化，并双向测序。

表 2 PCR 引物信息

Table 2 Primers information

序号 No.	目的序列 Target gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequence	参考文献 Reference
1	ITS	ITS-Leu ITS4	GTCCACTGAACCTTATCATTTAG TCCTCCGCTTATTGATATGC	Group et al., 2011
2	ITS2	ITS2-S2F ITS2-S3R	ATGCGATACTTGGTGTGAAT GACGCTTCTCCAGACTACAAT	陈士林，2015
3	*psbA-trnH*	fwd PA rev TH	GTTATGCATGAACGTAATGCTC CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	陈士林，2015
4	*matK*	390F 1326R	CGATCTATTCATTCAATATTTC TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	Group et al.，2011
5	*atpB-rbcL*	atpB-1 rbcL-1	ACATCKARTACKGGACCAATAA AACACCAGCTTTRAATCCAA	Chiang et al., 1998
6	*trnL-trnF*	trn-e trn-f	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC ATTTGAACTGGTGACACGAG	Lee et al., 2016
7	*rpoB*	1f 4r	AAGTGCATTGTTGGAACTGG GATCCCAGCATCACAATTCC	Sass et al., 2007

1.2.2 数据处理

利用 CodonCode Aligner V2. 0 (CodonCode Co.，美国)对测序峰图进行校对拼接，去除低质量序列及引物区，应用相似性搜索法(BLAST)进行防错，将正确的有效序列在 GenBank 注册新序列号(表 1)。运用 MEGA6.0 进行多序列比对，计算种内或种间 Kimura 2- parameter (K2P)遗传距离并构建 NJ 系统树。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和测序

ITS、ITS2 序列的 PCR 成功率虽然可以达到 100%，但其测序峰图表现为多位点的无规

则套峰，无法得到准确单一的序列。*matK* 的平均扩增成功率仅为 18.75%。*psbA-trnH*、*rpoB*、*trnL-trnF* 和 *atpB-rbcL* 的 PCR 扩增效率和测序成功率都为 100%，序列长度介于 325bp 至 645bp 之间，*psbA-trnH* 和 ropB 的变异位点为 0，*trnL-trnF* 有 1 个变异位点，*atpB-rbcL* 在 14 个样品间有 11 个变异位点（表 3）。

表 3 不同 DNA 条形码序列的评估

Table 3 Evaluation of the seven DNA barcode candidates

参数 Parameter	ITS	ITS2	*matK*	*psbA-trnH*	*atpB-rbcL*	*trnL-trnF*	*rpoB*
样本数量 No. of individual	14	14	14	14	14	14	14
PCR 成功率（%） PCR success（%）	100	100	18.75	100	100	100	100
测序成功率 (%) Sequencing success(%)	0	7.14	75	100	100	100	100
序列长度 (bp) Sequence length (bp)	/	246	619	642	642-645	325-326	341
变异位点数 No. of variable sites	/	/	1	0	11	1	0

2. 2 ***atpB-rbcL* 序列特征分析**

通过对 *atpB-rbcL* 序列比较发现，蓬莪术的 *atpB-rbcL* 序列长度为 642 bp，温郁金和广西莪术的序列长度均为 645 bp。广西莪术与温郁金相比，仅在 550 位点上存在一个 C 到 T 转换，而与蓬莪术相比存在 8 处碱基的不同，例如在 76 位点 C 到 T 转换，259 位点 T 插入，310 位点 C 到 T 转换，397 位点 C 到 T 转换，430 位点 4 个碱基 T 缺失等。待测样品中，江西新余、海南澄迈和临高的 *atpB-rbcL* 序列与温州温郁金的一致性为 100%，只有海南琼山与温州温郁金的 *atpB-rbcL* 序列存在一个碱基变异。

2.3 遗传距离计算及基于 ***atpB-rbcL*** 序列的系统进化树

应用 MEGA6.0 软件，基于 K2P 距离模型计算莪术不同基原植物间的遗传距离，其中广西莪术种内遗传距离均为 0，温郁金的种内的遗传距离为 0.000 4， 蓬莪术的种内遗传距离为 0.006 3；温郁金与广西莪术种间的平均遗传距离为 0.001 8，温郁金与蓬莪术之间的平均遗传距离均为 0.008 1，广西莪术和蓬莪术种间的遗传距离平均为 0.009 5。待测样品中，海南样品和温州产温郁金的遗传距离在 0～0.001 6 之间，平均遗传距离为 0.000 5，江西样品和温州产温郁金的遗传距离均为 0。

应用 MEGA6.0 软件构建基于 *atpB-rbcL* 序列的广西莪术、温莪术和蓬莪术的 NJ 系统树（图 1）。在 NJ 系统树上，温郁金 3 个居群、广西莪术 4 个居群和蓬莪术 2 个居群分别聚为单系分支，其中温郁金和广西莪术合聚为一大支，蓬莪术单独聚为一支，表明基于 *atpB-rbcL* 序列构建的 NJ 系统树可将温郁金、广西莪术、蓬莪术 3 个物种明显分开，而温郁金和广西莪术的关系较近、和蓬莪术关系较远。待测样品都与温州产温郁金聚在一个分支中（图 1）。

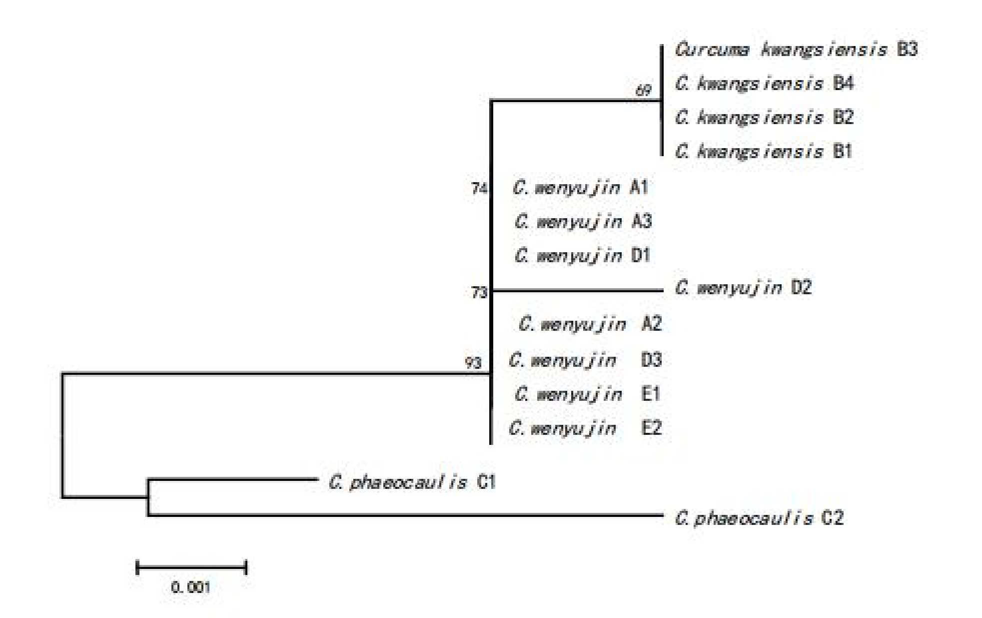


图 1 基于 NJ 法 (*atpB-rbcL* 数据) 构建的系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on NJ methods (*atpB-rbcL* data)

3 讨论

DNA 条形码技术自 2003 年提出以来，已成为全球生物分类研究的热点和方向（陈士林等，2013）。由于植物的核苷酸进化速率低于动物，且植物存在更多杂交和多倍化的进化事件，植物中没有哪一个单独的片段像动物 COI 一样，能够成为高效和通用条形码，因此筛选一个或多个适合植物分类的 DNA 条形码序列成为十分重要的研究内容（Chen et al.，2010; Group et al.,2011）。本研究在 ITS、ITS2、*atpB-rbcL*、*matK*、*psbA-trnH*、*trnL-trnF* 和 *rpoB* 等 7 条 DNA 条形码候选序列中，从 PCR 扩增的难易程度，测序成功率和变异程度等方面，筛选到了一条适宜鉴定莪术基原植物 DNA 条形码序列 *atpB-rbcL*。

核基因 ITS 和 ITS2 在莪术类植物间的测序成功率很低，Chen 等认为这主要是由于多倍体杂交，多年人工栽培造成的（Chen et al.，2014）。虽然可以通过构建单克隆载体的方式得到 ITS2 序列，但这无疑增加了成本和难度，并且在姜黄属内只能提供 46.7%分辨率（Chen et al., 2014）。*matK* 是植物 DNA 条形码研究的核心条形码序列之一（Leister et al.，1998），但它在本研究的样本中 PCR 扩增效率最低（18.75%），类似的问题在其他植物中也多有报道（Chen et al., 2014；Sass et al., 2007；Hollingsworth et al., 2009）。Chen（2014）等利用多对引物和多次摸索后，将姜黄属 *matK* 序列扩增成功率提高至 85.4%，却发现姜黄属 *matK* 序列不存在 barcode gap（Chen et al.，2014）。我们利用其序列进行分析，发现 *matK* 序列不能将莪术不同基原植物分开。从 PCR 扩增效率和测序成功率考虑，我们认为 *matK*、ITS 和 ITS2 这三条序列不适宜作为莪术基原植物鉴定的候选序列。

psbA-trnH、*ropB*、*trnL-trnF* 和 *atpB-rbcL* 这四条序列在本研究中的扩增和测序成功率均为 100%，但前三个序列在这些样本中极度保守、进化速率慢，其种间差异为零或差异极小，而 *atpB-rbcL* 存在丰富的变异，因此我们将其作为莪术不同基原植物鉴定的适宜序列。在此基础上，本研究基于 *atpB-rbcL* 序列，通过计算遗传距离和构建 NJ 系统树，将《中国药典》中莪术的三种基原植物明显区分开，同时鉴定结果说明海南和江西引种的样品都为温郁金。近年来海南种植莪术的规模越来越大，本文利用 DNA 条形码技术，将海南引种的莪术基原植物鉴定为温郁金，为其合理的开发和利用提供了保障。

本研究对莪术基原植物的 DNA 条形码鉴定进行了初步的探讨，筛选获得的 *atpB-rbcL* 序列对莪术不同基原植物的快速准确鉴定具有重要意义，但莪术基原植物的栽培品种众多，且分布范围广，因此进一步扩大取样范围十分必要。本研究的开展期望为莪术基原植物的品种选育、引种栽培等提供可行的方法，同时为姜黄属植物的分类和鉴定提供借鉴。

参考文献

CAO H, SASAKI Y, FUSHIMI H, et al., 2010. Authentication of *Curcuma* species (Zingiberaceae) based on nuclear 18S rDNA and plastid trn K sequences[J]. Acta Pharm Sin, 45(7): 926-933. [曹晖，佐佐木阳平，伏见裕利，等，2010．基于核18S rDNA和叶绿体*trnK*序列鉴定姜黄属植物[J]．药学学报，45（7）：926-933．]

CHEN J, ZHAO J, ERICKSON DL, et al., 2014. Testing DNA barcodes in closely related species of *Curcuma* (Zingiberaceae) from Myanmar and China[J]. Mol Ecol Resour, 5(2):337-348.

Chen SL, Yao H, Han JP, et al., 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species[J]. PLoS ONE, 5(1): e8613.

CHEN SL, YAO H, HAN JP, et al., 2013. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding[J]. Chin J Chin Mat Med, 38(2):141-148. [陈士林，姚辉，韩建萍，等,2013．中药材DNA条形码分子鉴定指导原则[J]．中国中药杂志，38（2）：141-148．]

CHEN SL, 2015. Standard DNA barcodes Chinese for materia medica in Chinese Pharmacopoeia[M]. Beijing: Science Press. [陈士林，2015．中国药典中药材DNA条形码标准序列[M]．北京：科学出版社．]

CHIANG T, 1998. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA[J]. Bot Bull Acad Sin, 39(4): 245-250.

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015. Pharmacopoeia of the People’s Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science Press. [国家药典委员会，2015．中华人民共和国药典[M]．北京：中国医药科技出版社．]

Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita, 2004. Flora of China[M]. Beijing: Science Press. 中国科学院中国植物志编辑委员会,2004．中国植物志[M]．北京：科学出版社．

GROUP CB, LI DZ, GAO LM, et al., 2011.Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. P Natl Acad Sci Usa, 108(49): 11964-19641.

HOLLINGSWORTH ML, ANDRA CA, FORREST L L, et al., 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants[J]. Mol Ecol Resour, 9(2): 439-457.

LEE SY, NG WL, MAHAT MN, et al., 2016. DNA Barcoding of the Endangered *Aquilaria* (Thymelaeaceae) and Its Application in Species Authentication of Agarwood Products Traded in the Market[J]. PLoS ONE, 11(4): e0154631.

LEISTER D, KURTH J, LAURIE DA, et al., 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes[J]. P Natl Acad Sci Usa, 95(1): 370-375.

LIU SL, WANG XH, JIANG CX, et al., 2016.RAPD-PCR analysis on different germplasm resources of Curcumae Rhizoma[J]. Chin Tradd Herb Drugs, 47(17): 3098-3102. [刘双利，王晓慧，姜程曦，等,2016．莪术种质资源的RAPD-PCR分析[J]．中草药，47（17）：3098-3102．]

MAO CQ, LU TL, JIANG HF, et al., 2013. Determination of curdione, curcumol, germacrone, and β-elemene in processed Curcumae Rhizoma from different habitats[J]. Chin Trad Herb Drugs, 44(3): 2834-2837. [毛春芹，陆兔林，姜国非，等．2013，HPLC法测定不同主产地莪术饮片中莪术二酮、莪术醇、吉马酮和β-榄香烯[J].中草药,44(3):2834-2837.]

SASS C, LITTLE PD, STEVENSON WD, et al.，2007. DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads[J]. PLoS ONE, 2(11): e1154.

SHEN LL, XU LZ, LÜ JQ, et al., 2014. Rhizome morphology and flowering characteristic of 5

species *Curcuma* plants[J]. J Zhongkai Univ Agric Eng, 27(4): 11-14. [沈荔荔，许丽珍，吕锦权，等，2014．5种姜黄属植物的根茎形态及其相关特性与开花特性[J]．仲恺农业工程学院学报，27（4）：11-14．]

SHEN Y, LI Y, LIU TT, et al., 2014. Microscopical and physicochemical identification of 3 sources of Curcumae Rhizoma[J]. Chemical Research and Application, 26(2): 267-270. [沈艳，李羿，刘婷婷，等，2014．3种基源莪术的显微及理化鉴定[J]．化学研究与应用，26（2）：267-270.]

TANG DC, ZANG WH, FENG HH, 2013. Influences of medicated serum of different cultivars of Ezhu (Rhizoma Zedoariae) on proliferation, apoptosis and nucleo-cytoplasmic ration human gastric carcinoma cells BGC823[J]. J Beijing Univ Trad Chin Med, 36(4): 254-257+26. [唐德才，臧文华，冯海红，2013．莪术不同品种含药血清对人胃癌细胞BGC823增殖、凋亡及核质比的影响[J]．北京中医药大学学报，36（4）：254-257+26．]

WU BY, LI M, 2012. Study on the correlation between chemical composition and quality of rhizoma zedoary rhizome[J]. J Chengdu Univ TCM, 35(3): 48-49+56. [吴伯英，李敏,2012. 多基原品种莪术化学成分与质量的相关性研究[J]．成都中医药大学学报，35（3）：48-49+56．]

WU ZQ, ZHAO XW, 2003. A preliminary discussion about introduction of new varieties of chinese herbal medicines from separate regions and their domestication from wildness[J]. J Agric Sci Technol, 5(3): 57-59. [吴正强，赵小文，2003．初论中草药异地引种与野生驯化[J]．中国农业科技导报，5（3）：57-59．]

XIAO XH, LIU SQ, SHI CH, et al., 2000. RAPD polymorphism and authentication of medicinal plants from Turmeric (*Curcuma* L.) in China[J]. Chin Trad Herb Drugs, 31(3): 209-212. [肖小河，刘峰群，史成和，等，2000．国产姜黄属药用植物RAPD分析与分类鉴定[J]．中草药，31（3）：209-212．]

XIAO XH, XIA WJ, QIN SY, et al., 2001. Pattern recognition of stereoscopic features of the leaves epidermis of Medicinal *Curcuma* plants in china by image analysis[J]. Chin J Chin Mat Med, 26(8): 523-528. [肖小河，夏文娟，秦松云，等，2001．国产姜黄属药用植物叶表皮显微图像模式识别[J]．中国中药杂志，26（8）：523-528．]

XIAO XH, ZHONG GY, SHU GM, et al., 2004. Numerical taxonomy of medicinal plants of *Curcuma* in China[J]. Chin J Chin Mat Med, 29(1): 15-24. [肖小河，钟国跃，舒光明，等，2004．国产姜黄属药用植物的数值分类学研究[J]．中国中药杂志，29（1）：15-24．]

YANG FQ, LI SP, CHEN Y, et al., 2005.The fingerprint of Ezhu by GC-MS [J]. Acta Pharm Sin, 40(11): 1013-1018. [杨丰庆，李绍平，陈莹，等，2005.中药莪术GC-MS指纹图谱研究[J]．药学学报，40（11）：1013-1018．]

ZANG WH, TANG DC, YING G, et al., 2014. Inhibition effects of compatibility of *Astragali radix* and Curcumae Rhizoma and combination with cisplatin on orthotopic tumor in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Exp Trad Med Form, 20(5): 131-136. [臧文华，唐德才，尹刚，等，2014．黄芪-莪术配伍及联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤生长的抑制作用[J]．中国实验方剂学杂志，20（5）：131-136．]

ZÁVESKÁ E, FÉR T, ŠÍDA O, et al., 2012. Phylogeny of *Curcuma* (Zingiberaceae) based on plastid and nuclear sequences: Proposal of the new subgenus Ecomata[J]. Taxon, 61(4): 747-763.

ZHANG YW, YANG RQ, 2010. Problems and proposals on the standards of curcuma oil and its preparations[J]. Drug Stand Chin, 11(3): 170-171+23. [张永文，杨瑞琪，2010.莪术油及其制剂的质量标准问题与建议[J]．中国药品标准，11（3）：170-171+23．]